



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 183 144**

⑤① Int. Cl.⁷: C07K 16/12

C07K 16/04

A61K 39/108

A61K 39/40

A23C 9/20

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **97910357.9**

⑧⑥ Fecha de presentación: **25.09.1997**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 941 251**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.1999**

④④ Título: **Uso de un preparado de inmunoglobulina para la preparación de un medicamento de uso oral para la prevención del síndrome urémico hemolítico así como un preparado para ello.**

③⑥ Prioridad: **09.10.1996 DE 196 41 466**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOP: **16.03.2003**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente: **16.03.2003**

⑦③ Titular/es: **Helge Karch, Dr.**

**Nikolausweg 10
97204 Höchberg, DE
Reinhard Lissner
Alfred Arnold
Wolfgang Möller, Dipl.-Chem. Dr. y
Hans-Iko Huppertz**

⑦② Inventor/es: **Karch, Helge;**

**Lissner, Reinhard;
Arnold, Alfred;
Möller, Wolfgang y
Huppertz, Hans-Iko**

⑦④ Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 183 144 T3

AC

DESCRIPCION

Uso de un preparado de inmunoglobulina para la preparación de un medicamento de uso oral para la prevención del síndrome urémico hemolítico así como un preparado para ello.

La presente invención se refiere, según la reivindicación 1, al uso de un preparado de inmunoglobulina con un alto contenido de anticuerpos frente a la hemolisina de EHEC para la preparación de un medicamento de uso oral para la prevención del síndrome urémico hemolítico tras infección por EHEC. Las reivindicaciones subordinadas se refieren a realizaciones preferidas del uso según la invención, así como a un preparado para el uso anteriormente citado.

Las *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) están cada vez más reconocidas como importantes agentes patógenos en el tracto intestinal humano. Son conocidas desde 1982 como causa de diarrea con sangre en seres humanos. La *E. coli* 0157 es a este respecto el serotipo de EHEC que se presenta más frecuentemente.

La *E. coli* 0157 se ha encontrado hasta ahora en todo el mundo, especialmente en los países nórdicos, y allí especialmente en los meses más cálidos del año. Las manifestaciones clínicas típicas de esta gastroenteritis causada por EHEC son vómitos, convulsiones y diarreas con sangre. Las causas más frecuentes para el inicio de la infección son carne contaminada y leche cruda no pasteurizada. Cuantos más casos de infecciones por EHEC se conocieron, se hizo más claro que la *E. coli* 0157 y otros serotipos de EHEC son responsables como causas importantes de la aparición del síndrome urémico hemolítico (SUH).

El SUH es un síndrome que se caracteriza por los síntomas típicos de una anemia hemolítica aguda, trombocitopenia y nefropatía. El SUH es la causa más frecuente de insuficiencia renal en la niñez. Pero se diagnostica cada vez más en adultos y personas mayores. Sin un adecuado tratamiento, la mortalidad es alta. Típicamente, el SUH se manifiesta durante y después de una gastroenteritis o una colitis con sangre, reconocible por un repentino nuevo empeoramiento del estado general, a menudo después de una mejora intermedia, con palidez y reducción de la producción de orina. Un grave efecto a largo plazo del SUH son las complicaciones renales, que pueden conducir a la pérdida de la función renal. Aproximadamente un 10% de los niños con diarrea asociada a EHEC desarrollan el síndrome urémico hemolítico. En aproximadamente un 30% de los casos, el SUH conduce a insuficiencia renal grave, y aproximadamente un 10% de los casos a la muerte, a pesar de los avances de la terapia de apoyo, como por ejemplo diálisis y recambio de plasma. Se cree actualmente que una mayoría de las insuficiencias renales posteriores, y por tanto de los trasplantes renales resultantes de ellas, están causados por un SUH no reconocido.

La mayoría de los aislados de EHEC obtenidos de pacientes con SUH forman, al contrario que todas las demás bacterias *E. coli*, grandes cantidades de verotoxinas codificadas por bacteriófagos (toxina de tipo Shiga, SLT), por ejemplo verotoxina 1 (SLT-I) y verotoxina 2 (SLT-II). La ac-

tividad de estas toxinas bacterianas no es comparable con las enterotoxinas de *E. coli* clásicas termolábiles o termoeestables o con las endotoxinas. Especialmente, la aparición de la verotoxina 2 está frecuentemente asociada al síndrome urémico hemolítico.

Normalmente, con agentes terapéuticos aplicados a enteritis, como por ejemplo antibióticos, puede estimularse la producción de toxinas y la liberación de verotoxinas de los aislados EHEC *in vitro*, y posiblemente también *in vivo*. Los anti-diarréicos inhibidores de la motilidad están igualmente contraindicados, puesto que potencian la resorción de las toxinas en el intestino. Todo esto conduce a un empeoramiento del pronóstico de la enfermedad por EHEC, y a un riesgo aumentado de desarrollo del SUH. Por ello, se evitan las terapias aplicadas a enteritis, y el desarrollo del SUH no puede hasta ahora inhibirse mediante ninguna medida eficaz.

Desde hace tiempo, se ha propuesto y ensayado también el uso de inmunoglobulinas para la profilaxis o la terapia del SUH.

En la solicitud PCT WO 89/10139 se describe un preparado con actividad anticuerpo de calostro de mamíferos no inmunizados, que según el ejemplo 13 presenta también anticuerpos frente a la verotoxina 1 (toxina de tipo Shiga, SLT-I) de las bacterias EHEC.

Si se administra por vía oral un preparado de calostro con alta actividad de anticuerpo frente a SLT-I a niños con una infección EHEC con identificación positiva de verotoxina, no se consigue una reducción apreciable o ninguna erradicación en absoluto *in vivo* de esta toxina en el intestino. Incluso después de 21 días desde el inicio de la terapia en un estudio controlado, se seguía identificando SLT-I en las heces en 7 de cada 10 pacientes.

Pirro, F. (*Veterinary Microbiology*, 43, 131-141, 1995) mostró que el calostro vacuno y el suero vacuno pueden neutralizar el efecto citotóxico de las verotoxinas *in vitro*. Aunque todas las muestras contenían anticuerpo frente a SLT-I, tenían sólo 14,7% de anticuerpos neutralizantes frente a SLT-II.

En ensayos en animales con liebres, la inmunoglobulina G humana no fue capaz de inhibir las enfermedades asociadas a SLT-II. La administración subcutánea de IgG humana tenía resultado sólo una hora después de la infección en la inhibición de la diarrea causada por SLT-I. Después de 6 ó 24 horas, no podía compararse ya ningún efecto (Havens, L., et al., *Microbiol. Immunol.*, 36, 1077-1085, 1992).

También en Finezzi, G. (*American Journal of Hematology*, 41, 165-169, 1992), se mostró en pacientes con síndrome urémico hemolítico que la administración de preparados de IgG intravenosa no presentaba resultados terapéuticos. Como terapia de elección, se propuso un recambio completo de plasma.

Bitzan, M., et al. (*Infection*, 21, 140-145, 1993) comprobaron en resumen que, en la mayoría de los pacientes con SUH, con la administración de los preparados de IgG disponibles actualmente no es de esperar un efecto terapéutico específico de verotoxina.

En S. Ashenazi, *et al.* (*Adv. Exp. Med. Biol.*, 310, 173-177, 1991) se describió que la adhesión de *E. coli* a la pared intestinal se inhibe mediante leche o calostro humanos. La inhibición se efectuaba mediante los oligosacáridos libres o restos de manosa de las glucoproteínas, pero no mediante los anticuerpos de la fracción de inmunoglobulina, puesto que la fracción de inmunoglobulina de la leche humana contiene sólo cantidades muy bajas de actividad anticuerpo frente a EHEC. Las inmunoglobulinas de leche humana o calostro no son adecuadas por tanto para la terapia de infecciones por EHEC y para la prevención del SUH. Por otro lado, la fracción de oligosacáridos o glicolípidos de leche o calostro humanos no pueden utilizarse en la práctica para la profilaxis del SUH, puesto que la disponibilidad para dicho uso es absolutamente insuficiente. Los resultados no pueden aplicarse además a la leche o el calostro de otros mamíferos, puesto que la composición de la fracción de oligosacáridos y glicoproteínas de la leche humana es muy diferente de la de la leche de otras especies.

En Beutin, L. (*Bundesgesundheitsblatt*, 10/94, 54) se caracterizaron detalladamente aislamientos de EHEC de muestras de heces. Un 67% mostraban la formación de SLT-II, y un 54% la formación de SLT-I. Las 54 cepas se manifestaban como hemolíticas, en las que en el 89% se identificaba la hemolisina de EHEC. En bacterias *E. coli* que no pertenecen al serotipo de EHEC, el fenotipo de formación de hemolisina de EHEC aparecía muy escasamente. Por ello, se han encontrado cada vez más aislamientos de EHEC que presentan la característica hemolisina de EHEC pero no SLT-I ni SLT-II.

En H. Schmidt *et al.* (*Infection and Immunity*, 63, 1055-1061, 1995), se describió la hemolisina codificada en plásmido de *E. coli* 0157. A la hemolisina de EHEC se le atribuye una importancia clínica, puesto que estaba presente en todas las cepas 0157 de *E. coli* ensayadas. Las hemolisinase describen como importantes factores de virulencia de las bacterias que pueden originar, entre otras, enfermedades extraintestinales, y que pueden reaccionar con diferentes células, por ejemplo linfocitos, granulocitos, eritrocitos y células renales. Aunque la hemolisina de EHEC presenta aproximadamente 70% de homología con la alfa-hemolisina de otras cepas de *E. coli*, no tiene lugar ninguna neutralización cruzada de la hemolisina de EHEC mediante anticuerpos frente a la alfa-hemolisina. Los pacientes con síndrome urémico hemolítico forman anticuerpos específicos frente a la hemolisina de EHEC en su suero. Sin embargo, estos anticuerpos específicos, así como los anticuerpos ampliamente extendidos frente a alfa-hemolisina, no son manifestamente capaces de inhibir el SUH o curarlo.

El cometido de la presente invención es por tanto proporcionar un preparado activo para la prevención del síndrome urémico hemolítico, de manera sencilla y a bajo coste, tras infecciones por EHEC.

Este cometido se resuelve según la invención utilizando por vía oral un preparado de inmunoglobulina con un alto contenido de anticuerpos frente a la hemolisina de EHEC, como se describe

en la reivindicación 1.

Sorprendentemente, se ha encontrado así que una administración oral de anticuerpos frente a esta hemolisina de EHEC es capaz de reducir drásticamente la frecuencia de deposición de los pacientes y de inhibir el desarrollo del SUH. En más del 80% de los tratamientos podía comprobarse por consiguiente una erradicación de la hemolisina y de las bacterias portadoras del gen de la hemolisina, de modo que el riesgo de desarrollo del SUH tras una infección por EHEC se inhibe drásticamente.

A causa de la baja propagación en seres humanos de bacterias EHEC, no pueden obtenerse preparados de inmunoglobulina humana polivalentes con una actividad suficientemente alta frente a hemolisina de EHEC, y eventualmente frente a SLT-II; y la inmunización de un gran número de seres humanos con bacterias EHEC o hemolisina es cuestionable desde el punto de vista ético.

Sorprendentemente, sin embargo, en la leche o en el calostro de vacas de regiones seleccionadas se encuentra un contenido esencialmente alto de actividad de anticuerpo frente a hemolisina de EHEC y frente a las bacterias portadoras del gen de la hemolisina de EHEC, que son capaces por tanto de neutralizar la toxina o las bacterias portadoras del gen de la toxina. En la solicitud PCT WO 89/10139, se comprueba que el calostro de mamíferos no inmunizados contiene anticuerpos frente a casi el espectro completo de toxinas de patógenos intestinales de origen coli. Pero en los siguientes años, se ha demostrado que en el calostro de vacas no inmunizadas, frente a algunas toxinas no estaba presente ningún anticuerpo o sólo en el calostro de unas pocas vacas (ejemplo SLT-II), o incluso que un alto título de anticuerpos encontrado *in vitro* no era protector *in vivo* (ejemplo SLT-I). Por ello, era sorprendente la actividad protectora de las inmunoglobulinas con actividad anticuerpo frente a la hemolisina de EHEC y frente a bacterias portadoras del gen de la hemolisina de EHEC.

Los preparados con un alto título de anticuerpos frente a la hemolisina de EHEC pueden obtenerse especialmente mediante el análisis de donantes individuales, por ejemplo vacas, y la selección de aquellos donantes con un alto contenido de anticuerpos frente a la hemolisina de EHEC. Eventualmente, puede evitarse esta selección de donantes individuales cuando se reúne la leche de vacas de rebaños que tienen un alto grado de contagio con la hemolisina de EHEC, y por tanto que presentan altas actividades anticuerpo naturales. Como alternativa, pueden inmunizarse vacas antes del parto con hemolisina de EHEC y eventualmente con bacterias que llevan el gen de la hemolisina de EHEC, para obtener una alta actividad anticuerpo en el calostro o en la leche. Por calostro se entiende en la presente memoria la leche de los primeros cinco días después del parto, mientras que la leche a partir del sexto día después del parto se caracteriza como leche. Se tienen en cuenta principalmente también para la inmunización como animales fuente otros mamíferos lactantes. A estos pertenecen cabras y ovejas.

Un preparado de inmunoglobulina según la invención puede prepararse por ejemplo a partir de

calostro bovino. Para ello, se desgrasa el calostro y se somete a un calentamiento corto de 20 segundos a 72°C. El calostro desnatado se ajusta a pH 4,4 a 4,7, y se separa la caseína precipitada mediante filtración o centrifugación. El suero del calostro se concentra mediante ultrafiltración, y a continuación se esteriliza por filtración. Si se utiliza calostro del primer ordeño, el preparado contiene una proporción de inmunoglobulina de 70-80% referida a la proteína total. El preparado puede confeccionarse líquido o secarse por pulverización o liofilización. Como alternativa, puede aislarse también el suero de la leche de vaca, como precipita por ejemplo en la preparación de queso, mediante técnicas cromatográficas, mediante ultrafiltración/filtración por diálisis o mediante reacciones de precipitación de la fracción de inmunoglobulina.

Para aumentar la actividad anticuerpo frente a la hemolisina de EHEC, las vacas pueden inmunizarse con hemolisina de EHEC, y preferiblemente además con antígenos de superficie de bacterias portadoras del gen de la hemolisina de EHEC, y de forma especialmente preferida además con SLT-II. La inmunización se realiza a este respecto preferiblemente con las toxinas o bacterias inactivadas, y puede realizarse por vía subcutánea en la ubre o intranasal. Para mejorar el resultado de la vacunación, se añade preferiblemente un coadyuvante (por ejemplo Titermax, Vertrieb Sa, Serva, Heidelberg) de vacuna.

El preparado de inmunoglobulina obtenido como anteriormente se ha descrito o de otra manera conocida (por ejemplo de huevos de gallinas inmunizadas) con un alto contenido de anticuerpos frente a la hemolisina de EHEC, se administra por vía oral en cantidades de 2-50 g/día en forma de un polvo, gragea, comprimido o se disuelve en agua, leche u otra garga.

Preferiblemente, el preparado presenta además un alto contenido de anticuerpos frente a antígenos de superficie de bacterias portadoras del gen de la hemolisina de EHEC, que pueden obtenerse como se describe anteriormente.

Puede ser además ventajoso un contenido de anticuerpos frente a toxina II de tipo Shiga (SLT-II).

El preparado muestra especialmente el siguiente título, referido a una solución de inmunoglobulina con 5 g de contenido de inmunoglobulina/100 ml: en la inmunotransferencia según Gunzer *et al.*, (*J. Clin. Microbiol.*, 31 (1993), 2604-2610) y Schmidt *et al.* (*Infect. Immun.*, 63, (1995), 1055-1061), el título de anticuerpo reactivo frente a la hemolisina de EHEC debe ser $\geq 1:6400$. Un 50% de la actividad hemolítica de la hemolisina de EHEC frente a los eritrocitos, según Bauer *et al.* (*Infect. Immun.*, 64 (1996), 167-175), debe neutralizarse todavía con una dilución de la solución de inmunoglobulina $\geq 1:50$. El título de anticuerpos neutralizantes frente a SLT-

II, medido en el ensayo de neutralización estándar según Schmidt *et al.* (*Infect. Immun.*, 61 (1993), 534-543) debe ser $\geq 1:800$.

El preparado está especialmente indicado para diarreas agudas con sangre y frecuentes, acompañadas de dolores de vientre de tipo espasmódico, especialmente en niños y personas mayores con infección por EHEC identificada o supuesta, para inhibir el desarrollo posterior del SUH.

La invención se ilustra detalladamente mediante el siguiente ejemplo.

Ejemplo

De 36 niños con infección por EHEC identificada, se trataron 18 niños de 14 días de edad cada uno 3 veces con 7 g de un preparado de inmunoglobulina de calostro con alto contenido de anticuerpos frente a la hemolisina de EHEC y SLT-II. El grupo de control recibió la misma cantidad de gelatina bovina como placebo. Los pacientes se observaron otros 7 días.

El preparado de inmunoglobulina se obtuvo de calostro de vacas de un rebaño cerrado con alta prevalencia de EHEC. Para ello, se desgrasó el primer ordeño de calostro y se sometió a un calentamiento corto de 20 segundos a 72°C. El calostro desnatado se ajustó a pH 4,5, y se separó la caseína precipitada mediante filtración. El suero de calostro se concentró mediante ultracentrifugación, se esterilizó por filtración y se liofilizó. El preparado contenía una proporción de inmunoglobulina de 75%, referida a la proteína total. En la inmunotransferencia, pudo identificarse hasta una dilución de 1:12800 de anticuerpos reactivos frente a la hemolisina de EHEC. Un 50% de la actividad hemolítica de la hemolisina de EHEC frente a eritrocitos pudo neutralizarse con una dilución 1:100. El contenido de anticuerpos neutralizantes frente a SLT-II era identificable a una dilución de 1:1600.

Después de la terminación del estudio, la frecuencia media de deposición en el grupo de tratamiento era de 1 deposición al día. En el grupo de placebo, se observaron 3 deposiciones al día.

En el grupo de tratamiento se encontraron bacterias portadoras del gen de la hemolisina de EHEC sólo en aproximadamente un 11%, en el grupo de placebo en cambio, en aproximadamente 43% de los pacientes analizados.

En el grupo de tratamiento, no se identificó después de 21 días ninguna bacteria portadora del gen SLT-II, en el grupo de placebo se observaron en cambio todavía éstas en 2 de 5 pacientes.

Con el tratamiento con el preparado de inmunoglobulina según la invención no se observó el SUH. Tanto la eliminación de las bacterias portadoras del gen de la hemolisina de EHEC como de las portadoras del gen SLT-II, y la reducción significativa acompañada de la frecuencia de deposiciones, redujeron drásticamente el riesgo de desarrollo del SUH.

REIVINDICACIONES

1. Uso de preparados de inmunoglobulina con un contenido de anticuerpos frente a la hemolisina de EHEC según un título de $\geq 1:6400$ de una solución de 5 g de inmunoglobulina por 100 ml de solución de inmunoglobulina, para la preparación de un medicamento de uso oral para la prevención del síndrome urémico hemolítico tras infección por EHEC.

2. Uso de preparados de inmunoglobulina según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el preparado de inmunoglobulina presenta además un alto contenido de anticuerpos frente a antígenos de superficie de bacterias portadoras del gen de la hemolisina de EHEC.

3. Uso de preparados de inmunoglobulina según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el preparado de inmunoglobulina presenta además un contenido de anticuerpos frente a la toxina II de tipo Shiga según un título de $\geq 1:800$ de una solución de 5 g de inmunoglobulina por 100 ml de solución de inmunoglobulina.

4. Uso de preparados de inmunoglobulina según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el preparado presenta el título de anticuerpos mediante análisis y selección de donantes individuales.

5. Uso de preparados de inmunoglobulina

según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el preparado presenta el título de anticuerpos mediante la inmunización de donantes individuales.

6. Uso de preparados de inmunoglobulina según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el preparado de inmunoglobulina se obtiene de la leche o el calostro de mamíferos lactantes.

7. Uso de los preparados de inmunoglobulina según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque el preparado de inmunoglobulina se obtiene de la leche o el calostro de vacunos.

8. Preparado de inmunoglobulina que puede obtenerse a partir de leche o calostro de mamíferos lactantes, **caracterizado** porque presenta un contenido de anticuerpos frente a la hemolisina de EHEC según un título de $\geq 1:6400$ de una solución de 5 g de inmunoglobulina por 100 ml de solución de inmunoglobulina.

9. Preparado de inmunoglobulina según la reivindicación 8, **caracterizado** porque presenta además un alto contenido de anticuerpos frente a antígenos de superficie de bacterias portadoras del gen de la hemolisina de EHEC.

10. Preparado de inmunoglobulina según la reivindicación 8 ó 9, **caracterizado** porque puede obtenerse a partir de leche o calostro de vacunos.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.